

Emploi de particules de latex dans la sérologie de la péripneumonie des bovidés (réaction d'agglutination indirecte)

par P. PERREAU et D. BERGERON

Depuis les travaux de SINGER et PLOTZ (6) qui mirent au point, pour le diagnostic de la polyarthrite chronique évolutive, une réaction d'agglutination employant des particules de latex sensibilisées, plusieurs applications de cette technique sérologique sont apparues, qui touchent à des domaines variés de la pathologie : histoplasmoses (SASLAW et CARLISLE (5)), leptospirose (MURASCHI (4)), brucellose (FLECK et EVENCHIK (3)), trichinose, lupus érythémateux, etc...

Dans tous ces cas, on a recherché un moyen commode de diagnostic et l'on conçoit que la méthode ait été essayée surtout pour des affections dont la sérologie est pour l'instant peu aisée à exploiter, parasitoses et mycoses notamment.

Pour l'étude de la péripneumonie des bovidés nous disposons déjà de plusieurs méthodes sérologiques dont la plus sûre, semble-t-il, est la réaction de déviation du complément, avec ses diverses modalités : CAMPBELL et TURNER, NEWING, KOLMER, etc...

Cependant, il nous a paru intéressant d'essayer une méthode d'agglutination indirecte utilisant comme support d'antigène des particules inertes ; nous nous sommes décidés pour les particules de polystyrène de préférence à celles de collodion pour de simples raisons de commodité : le latex est vendu en suspension prête à l'emploi alors que la préparation d'une suspension correcte de collodion est un long travail.

Au départ, nous n'espérions pas obtenir des résultats supérieurs à ceux que fournit l'hémagglutination passive, qui a déjà fait l'objet de recherches (2) et qui constitue une méthode très sensible soit pour titrer les anticorps d'un sérum, soit pour caractériser les antigènes spécifiques de *Mycoplasma mycoides* lorsqu'elle est employée selon le processus général des réactions d'inhibition ; mais les hématies de mouton, que l'on emploie le plus souvent, ont une activité antigénique propre et il est indispensable d'absorber préalablement les sérums bovins que l'on soumet à l'hémagglutination passive.

Nos essais nous ont montré en effet qu'environ 10 p. 100 des sérums bovins (il s'agit ici des zébus adultes du Tchad) possèdent des anticorps anti-hématies de mouton à des titres variant entre le 1/5 et le 1/40.

L'absorption préalable d'un sérum par des hématies peut être considérée comme une banale opération de laboratoire ; il n'en est pas moins vrai que l'on a intérêt à la supprimer, surtout lorsqu'au cours d'études immunologiques on éprouve un grand nombre de sérums.

L'emploi d'une suspension de latex devait donc permettre cette suppression et, en outre, la standardisation de cet antigène pouvait se faire, nous semblait-il, de façon à la fois plus facile et plus rigoureuse que celle d'une suspension d'hématies.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Latex : C'est le Bacto-Latex Difco, suspension de particules de polystyrène dont le diamètre

moyen est de $0,81 \mu$. Ce produit est prêt à l'emploi et doit être conservé au réfrigérateur entre 2 et 10°C . Nous préparons avec ce latex commercial une suspension à 1 p. 100, en solution physiologique tamponnée (P. B. S. de DULBECCO et VOGT), qui est ensuite sensibilisée et standardisée.

Antigènes : Plusieurs antigènes ont été éprouvés, mais deux au moins nous ont donné d'excellents résultats :

1^o Un antigène obtenu par l'action des ultrasons sur une suspension de germes en eau distillée. Cette suspension est faite à raison de 2 mg en poids sec de *M. mycoïdes* par ml ; elle est soumise durant 30 minutes aux ultra-sons (appareil MSE-Mullard, 20 kilocycles/seconde) puis centrifugée. C'est le surnageant qui constitue l'antigène sensibilisant.

2^o Le « galactane » de *Mycoplasma mycoïdes*, extrait par la méthode de Westphal (mélange eau-phénol à 68°) de corps microbiens lyophilisés. Nous n'insistons pas ici sur cette technique très classique pour les bactéries gram-négatives et déjà appliquée au fractionnement antigénique de *M. mycoïdes* par BUTTERY et PLACKETT (1) d'une part VILLEMOT, PROVOST et QUEVAL (7) d'autre part

Les antigènes sont dilués eux aussi en P. B. S.

Sensibilisation des particules de latex :

La suspension à 1 p. 100 reçoit un égal volume de solution d'antigène et le mélange bien agité est laissé une heure à 37° .

Après une première centrifugation qui élimine l'excès d'antigène, les particules sont lavées une fois en P. B. S. et recueillies par une seconde centrifugation ; comme les particules de latex sont très petites ($0,81 \mu$ de diamètre moyen), ces deux centrifugations doivent se faire à vitesse assez élevée. Nous opérons en général à 10.000 tours sur une centrifugeuse Servall (Rotor SS-34) durant 30 minutes, ou à 6.000 tours durant 40 minutes sur une centrifugeuse Jouan E. 57 (étoile A).

Il est essentiel de séparer très nettement le culot de latex du surnageant car, même en bonnes conditions, il est difficile de ne pas perdre une certaine quantité de particules au cours des décantations ; aussi standardisons-nous ensuite

la suspension sensibilisée de façon à opérer en conditions constantes.

Standardisation de la suspension :

La néphélométrie s'est révélée le moyen le plus commode ; le culot de latex sensibilisé et lavé est remis en suspension en P. B. S. de façon telle que sa densité optique soit égale à celle de la suspension initiale de latex à 1 p. 100 (division 110 du tambour de l'électro-colorimètre tricellule Jobin et Yvon).

Ces particules sensibilisées sont conservées à 4° en attendant l'emploi.

Exécution de la réaction :

Elle se fait très simplement en distribuant 0,4 ml de la suspension antigénique dans chacun des tubes d'une galerie de 10 tubes en moyenne ; nous employons en pratique des tubes à hémolyse à bords droits (tubes de Kahn), car la centrifugation nécessaire à la lecture de la réaction exige, bien qu'elle soit modérée, une verrerie assez résistante.

On ajoute ensuite 0,4 ml des différentes dilutions de sérum en commençant par la dilution au 1/5 ; la dilution terminale du sérum dans le premier tube est donc le 1/10.

Après agitation, le portoir est placé à 37° durant une heure ; il est préférable d'agiter plusieurs fois les tubes au cours de ce séjour à l'étuve.

Ils sont ensuite centrifugés durant 3 à 5 minutes sur une centrifugeuse Jouan E. 57 (couronne C) à 3.500 tours environ.

La lecture est faite immédiatement et il est pratique d'agiter les tubes pour juger du degré d'agglutination.

RÉSULTATS ET COMMENTAIRES

La lecture de l'agglutination est facile ; nous utilisons en général un système de notation à quatre croix qui permet d'apprécier l'intensité de la réaction.

La photographie de la figure n° 1 montre une réaction positive type ; dans les premiers tubes, le surnageant est absolument limpide, toutes les particules de latex sont agglutinées en gros agrégats que la centrifugation a collés au fond des tubes.



Fig. 1. — Cette photo montre l'aspect typique d'une réaction positive ; les trois premiers tubes sont positifs ++++ (selon notre notation), mais le 3^e tube a été vigoureusement agité pour montrer que les agglutinats remis en suspension ne se sont pas dissociés. Le 4^e tube est positif ++ et le 5^e négatif.

Ces agglutinats sont stables et résistent, malgré une fragmentation partielle, à une agitation déjà énergique, ce qui constitue un avantage très appréciable pour la lecture.

Les tubes négatifs conservent leur aspect laiteux identique à celui du tube témoin antigène.

Le passage de la dernière dilution de sérum franchement positive (++++) à la première dilution négative se fait par une ou deux dilutions intermédiaires seulement.

La centrifugation terminale (qui précède la lecture) doit se faire à une vitesse optimum qu'il est facile de déterminer ; pour une centrifugeuse donnée, on choisit après quelques essais la durée et la vitesse qui laissent en suspension les particules non agglutinées et envoient au fond des tubes tous les agglutinats de quelque taille qu'ils soient.

Une augmentation notable de la vitesse ou de la durée de cette centrifugation se traduit d'ailleurs par un accroissement de la taille des agglutinats et non pas par une différence du titre du sérum testé.

La fidélité de la réaction est très bonne ; comme pour toute autre réaction sérologique, elle est fonction de la rigueur avec laquelle la suspension antigénique est standardisée et les conditions de la réaction reproduites.

De tests comparatifs effectués sur 200 sérums bovins environ, nous pouvons conclure que la sensibilité de cette épreuve est comparable à celle de l'hémagglutination passive, c'est-à-dire

dix à vingt fois plus grande que celle de la séroprécipitation.

Le tableau n° 1 montre, à titre indicatif, la grande similitude des résultats obtenus d'une part avec les particules de latex employées selon la méthode décrite et d'autre part avec les hématies de mouton sensibilisées par le même antigène et utilisées en suspension à 1 p. 100 ; les sérums ont été prélevés sur des zébus infectés expérimentalement* :

La suspension de particules de latex sensibilisées constitue un antigène stable ; une fois préparée, elle conserve son activité pendant au moins une semaine sans altération aucune ; ce qui est impossible avec des hématies à moins de formoler celles-ci (ce qui complique alors la méthode d'hémagglutination).

La quantité d'antigène nécessaire à la sensibilisation des particules de latex est très faible : une solution de galactane à 4 mg/ml est encore active à la dilution du 1/1.000, c'est-à-dire que 4 µg sont suffisants pour sensibiliser efficacement les particules contenues dans 1 ml d'une suspension de latex à 1 p. 100 ; il faut diluer jusqu'au 1/10.000 pour obtenir une réaction franchement négative avec un sérum positif.

* Ces sérums nous ont été envoyés par nos confrères : A. PROVOST, du laboratoire de Farcha à Fort-Lamy et M. REGNOULT, du laboratoire de Hann à Dakar, que nous remercions très vivement.

Il s'agit d'animaux infectés par la voie bronchique selon la méthode utilisée au Laboratoire de la Santé Animale, C. S. I. R. O., Parkville, Australie.

TABLEAU I. — Comparaison entre les 2 méthodes d'agglutination indirecte (hématies de mouton et particules de latex)

Dilutions des sérums :

| N° des ani-maux | Epreuves sérologiques | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 | 1/640 | 1/1280 | 1/2560 | 1/5120 | 1/10240 |
|-----------------|-----------------------|------|------|------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|
| 503 | HA* | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | — | — | — |
| | LA* | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 1 | — | — |
| 505 | HA | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | — | — | — | — | — |
| | LA | 4 | 4 | 4 | 2 | 1 | — | — | — | — | — |
| 509 | HA | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | — | — |
| | LA | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 1 | — | — | — |
| 510 | HA | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | — | — | — |
| | LA | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 1 | — | — |
| 511 | HA | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 1 | — | — |
| | LA | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 1 | — | — | — |
| B ₃ | HA | 4 | 4 | 3 | 2 | 1 | — | — | — | — | — |
| | LA | 4 | 4 | 3 | 2 | — | — | — | — | — | — |
| B ₄ | HA | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | — | — | — | — | — |
| | LA | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | — | — | — | — | — |

LA : Agglutination des particules de latex (suspension à 1 p. 100).

HA : Agglutination en tubes des hématies de mouton ; celles-ci sont également en suspension à 1 p. 100 et la réaction se fait par addition de 2 volumes égaux : 0,4 ml de sérum + 0,4 ml de suspension d'hématies. Elles peuvent être fraîches ou formolées ; les résultats sont comparables.

Les antigènes préparés avec des suspensions à 2 mg/ml en poids sec de *M. mycoïdes* traitées par les ultra-sons sont actifs jusqu'à la dilution 1/250, parfois jusqu'à 1/500.

Si nous avons eu d'excellents résultats avec les produits de la désintégration ultra-sonique de *M. mycoïdes*, il n'en est pas moins vrai que nous lui préférons le « galactane » (selon PLACKETT et BUTTERY) pour sa stabilité bien meilleure.

Ce dernier se conserve en solution 3 mois au moins sans perte appréciable de son activité antigénique si l'on prend la précaution de le tenir à l'abri des contaminations bactériennes ; les extraits ultra-soniques n'ont qu'une activité brève lorsqu'ils sont conservés en solution (même à la température de 4° C) et exigent la congélation ou la lyophilisation si l'on veut maintenir leur pouvoir antigénique.

Le « galactane » que nous avons le plus souvent employé était le produit brut obtenu en fin de dialyse (après élimination du phénol) ; il contenait 32 p. 100 en poids d'acide nucléique.

La présence de ce dernier semble n'avoir gêné aucunement l'activité antigénique du produit total ; il est vraisemblable que les particules de latex n'adsorbent électivement que les molécules de polyosides et que la centrifugation de lavage élimine la majeure partie de l'acide nucléique.

Pour sensibiliser la suspension de latex, nous avons essayé d'autres préparations :

a) le surnageant d'une culture en bouillon de *M. mycoïdes*, âgée de 8 jours, qui s'est révélé incapable de sensibiliser les particules de latex (il s'agit du milieu Tryptose-Yeast Extract Difco-sérum de cheval) ;

b) le liquide de lavage des germes après leur récolte, qui s'est également montré un mauvais antigène.

Nous avons pensé d'abord qu'une destruction assez notable des micro-organismes accompagnait les opérations de centrifugation et de lavage et qu'il s'ensuivait une perte importante d'antigène ; cela ne semble pas se confirmer et il est

TABLEAU II. — Réaction d'inhibition

| | | Dilutions du sérum | | | | | | | |
|---|--------|--------------------|------|------|-------|-------|-------|--------|--------|
| | | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 | 1/640 | 1/1280 | 1/2560 |
| Témoin : | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 1 |
| Epreuve d'inhibition : | | | | | | | | | |
| Dilutions de l'antigène (liquide d'œdème) | pur | 1 | tr | — | — | — | — | — | — |
| | 1/5 | 4 | 3 | 2 | 1 | — | — | — | — |
| | 1/25 | 4 | 4 | 4 | 2 | 1 | — | — | — |
| | 1/100 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | — | — |
| | 1/500 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 1 | tr |
| | 1/2500 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 1 | tr |
| | 1/5000 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 1 |

N. B. : Chaque tube reçoit { 0,4 ml de dilution de sérum.
0,4 ml de dilution d'antigène.

- après une heure à 37° on ajoute 0,8 ml de latex sensibilisé.
- pour la galerie témoin, l'antigène est remplacé par 0,4 ml de P. B. S.
- le volume total est donc de 1,6 ml.

vraisemblable que *M. mycoides* en culture stagnante de 8 jours ou aérée de 3 jours (comme c'est le cas dans notre laboratoire) est beaucoup moins fragile qu'on pourrait le croire.

Cette agglutination indirecte peut, tout comme l'hémagglutination passive, s'utiliser sous forme réaction d'inhibition afin de déceler l'antigène spécifique de *M. mycoides*.

Le tableau n° 2 en donne un exemple ; l'agent inhibiteur est ici du liquide d'œdème sous-cutané (consécutif à une inoculation virulente) prélevé sur un zébu.

CONCLUSION

Il est donc possible d'employer des particules de latex (polystyrène) pour une réaction d'agglutination indirecte dans la sérologie de la péripneumonie bovine.

Cette méthode, de sensibilité comparable à celle de l'hémagglutination passive, ne peut constituer une méthode pratique de dépistage étant donné qu'elle nécessite l'emploi d'une centrifugeuse rapide pour la préparation de la suspension antigénique.

C'est avant tout une méthode d'étude qui offre selon nous, les avantages suivants :

1. une lecture facile ;
2. une grande stabilité de la suspension antigénique lorsqu'on emploie le « galactane » de *M. mycoides*, suspension dont la standardisation est également facile ;
3. enfin l'absence d'antigénicité des particules de latex, ce qui supprime l'opération d'absorption préalable des sérums, obligatoire avec des hématies.

Institut d'Elevage et de Médecine
vétérinaire des Pays tropicaux

SUMMARY

The use of particles of latex in the serological diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia an indirect agglutination reaction

The use of particles of latex (Bacto-Latex Difco) results in an indirect agglutination reaction which can be applied to the serology of bovine pleuropneumonia.

The method provides a sensitivity comparable with that of passive haemagglutination. The reaction is easily read and has the advantage that too much absorption of the test sera does not occur.

The antigens which give the best results are galactane and the products of ultrasonic disintegration of *M. mycoides*.

It is a laboratory study method and not a practical diagnostic test.

RESÜMEN

**Empleo de partículas de látex en la serología de la perineumonía de los bovides
reacción de aglutinación indirecte**

La utilización de partículas de látex (Bacto-Látex-Difco) permite realizar una reacción de aglutinación indirecte, aplicada a la serología de la perineumonía.

Este método es de una sensibilidad comparable ala de la hemoaglutinacion pasiva ; es de lectura facil y tiene la ventaja de no exigir una absorción previa de los sueros analizados.

Los antígenos sensibilizantes que dan mejor resultado son el « galactane » y los productos de desintegracion ultrasónica de « *M. mycoides* ».

Es un método de estudio, y no un método práctico de depistaje.

BIBLIOGRAPHIE

1. BUTTERY (S. H.), and PLACKETT (P.). — **A specific polysaccharide from *Mycoplasma mycoides*** *J. Gen. Microbiol.* 1960, **23** ; 357-68.
2. COTTEW (G. S.). — **Indirect haemagglutination and haemagglutination inhibition with « *Mycoplasma mycoides* »** *Aust. Vét. J.*, 1960, **36** ; 54-6.
3. FLECK (L.), and EVENCHIK (Z.). — **Latex agglutination test with Brucella antigen and antiserum.** *Nature*, London, 1962, **194** ; 548-60.
4. MURASCHI (T. F.). — **Latex-leptospiral agglutination test.** *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1958, **99** ; 235-38.
5. SASLAW (S.), and CARLISLE (H. N.). — **His-toplasmin-Latex agglutination test II-Resulst with human sera.** *Proc.. Soc. Exp. Biol. Med.* 1958, **97** ; 700-3.
6. SINGER (J. M.), and PLOTZ (C. M.). — **The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rhumatoïd arthritis.** *Am. J. Med.* 1956, **21** ; 888-92.
7. VILLEMOT (J. M.), PROVOST (A.), and QUEVAL (R.). — **Endotoxin from *Mycoplasma mycoides*** *Nature*, Lond. 1962, **193** ; 906-7.